

Novos Materiais para Embalagens: Películas Biodegradáveis e com Atividade Antioxidante

Manuel Ferreira de Carvalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Margarida Moldão Martins

Co-orientador: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Isabel Maria Rôla Coelho, Professora Auxiliar com Agregação do(a) Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

É com grande estima que agradeço a todos os que direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Margarida Moldão e ao Doutor Vitor Alves por todo o apoio e conhecimento transmitido durante o trabalho experimental, sem descuidar as palavras de apoio e incentivo no decorrer da elaboração desta redação.

Ao projeto “MOBFOOD – Mobilização de Conhecimento Científico e Tecnológico em Resposta aos Desafios do Mercado Agroalimentar (POCI-01-0247-FEDER-024524)”, cujo apoio financeiro foi essencial à realização do trabalho.

À minha família, por não desistirem de mim. Aos meus amigos, especialmente aos Chafalis e ao David por me apoiarem nos momentos mais difíceis, sem deixarem de estar presentes nos bons momentos. Acima de tudo, à minha namorada, pelas horas de companheirismo, para que tudo isto se tornasse possível.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar películas biodegradáveis com atividade antioxidante (AAO). Usou-se o quitosano para formar a matriz polimérica e extratos etanólicos de *Camellia sinensis* (Chá-verde) e de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) como fontes de compostos bioativos. Estes extratos foram incorporados diretamente nas películas ou após a sua encapsulação por *spray drying* usando inulina como material de parede.

Os microencapsulados apresentaram uma carga de compostos fenólicos de $7,66 \times 10^{-3}$ mg EAG/mg micropartículas e $1,45 \times 10^{-2}$ mg EAG/mg micropartículas, para o alecrim e chá-verde, respetivamente. Relativamente à sua AAO, as microcápsulas registaram 2,99 mmol Trolox/mg micropartículas e 2,14 mmol Trolox/mg micropartículas, para o alecrim e chá-verde, respetivamente, pela metodologia ABTS.

Os microencapsulados foram incorporados de modo a adicionar uma concentração de 1,84 mgEAG/g película. As películas foram armazenadas e monitorizou-se a sua AAO ao longo do tempo. Através do método FRAP, observou-se, ao fim de 30 dias, uma redução da AAO em 50%, para as películas com extrato livre, durante o armazenamento a 4 °C na ausência de luz, e a perda total da sua atividade a 22 °C com 12 horas de luz por dia, passados 15 dias. Ao fim de 30 dias, quando acondicionadas a 4 °C na ausência de luz, as películas com microcápsulas com extrato de alecrim revelaram uma manutenção da AAO entre 70-75%, e para as com extrato de chá-verde a retenção da AAO foi de 89-100%. Quando sujeitas a condições de temperatura de 22 °C e 12 horas de luz por dia, observou-se, ao fim de 30 dias, uma manutenção de 75–100% da AAO, para as películas com microcápsulas de alecrim e 75– 90% para as películas com microcápsulas de chá-verde. Os resultados revelam que a incorporação de compostos bioativos microencapsulados em películas de quitosano tem elevado potencial no desenvolvimento de películas bioativas e biodegradáveis.

Palavras-chave: Películas bioativas, Microencapsulação, Alecrim, Chá-verde, Inulina, Quitosano.

Abstract

This work aimed to produce and characterize biodegradable films with antioxidant activity (AAO). Chitosan was used as a material to form the polymeric matrix and ethanolic extracts of *Camellia sinensis* (Green Tea) and *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) as sources of bioactive compounds. These extracts were incorporated directly into the films or after their encapsulation by spray drying using inulin as the wall material.

The microencapsules produced showed a phenolic compounds load of $7,66 \times 10^{-3}$ mg EAG / mg micropartículas and $1,45 \times 10^{-2}$ mg EAG / mg micropartículas, for rosemary and green tea, respectively. Regarding their AAO, the microcapsules registered 2.99 mmol Trolox / mg microparticles and 2.14 mmol Trolox / mg microparticles, for rosemary and green tea, respectively, using the ABTS methodology.

The microcapsules containing the rosemary and green tea extracts were incorporated into the films in order to add a concentration of 1.84 mg EAG / g film. The films produced were stored in two different conditions and their AAO was monitored over time.

Through the FRAP method, after 30 days, a 50% reduction in AAO was observed for films with free extract during storage at 4 °C in the absence of light, and a total loss of their AAO at 22 °C with 12 hours of light per day. Films with microcapsules with rosemary extract showed a maintenance of AAO between 70-75%, and for films with green tea extract the retention of AAO was 89-100%, when stored at 4 °C in the absence of light during 15 days. When subjected to temperature conditions of 22 °C and 12 hours of light per day during 30 days, a maintenance of 75–100% of AAO was observed, for films with microcapsules of rosemary and 75– 90% for films with microcapsules of green tea.

The results obtained reveal that the incorporation of microencapsulated bioactive compounds in chitosan films has high potential in the development of bioactive and biodegradable films.

Keywords: Bioactive films, Microencapsulation, Rosemary, Green Tea, Inulin, Chitosan.

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Índice de figuras	5
Índice de tabelas	6
Introdução e Objetivos.....	1
2. Enquadramento teórico	3
2.1. Embalagem para alimentos.....	3
2.1.1. Embalagens biodegradáveis e bioativas	3
2.1.2. Materiais utilizados na produção de embalagens biodegradáveis e bioativas	5
2.2. Extratos Naturais.....	6
2.2.1. Rosmarinus officinalis L.	7
2.2.2. Camellia sinensis L.	7
2.2.3. Métodos de obtenção de extratos	8
2.3. Encapsulamento de compostos bioativos	9
2.3.1. Materiais de Parede de Encapsulamento	10
Inulina	10
2.3.2. Processos de Microencapsulação	11
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Preparação dos extratos.....	14
3.2. Microencapsulação dos Extratos Naturais	14
3.2.1. Preparação das soluções de alimentação	14
Soluções para micropartículas de inulina com extrato	14
3.2.2. Condições do processo de secagem.....	15
3.3. Preparação das Películas.....	15
3.3.1. Películas de quitosano sem incorporação micropartículas.....	15
3.3.1. Películas de quitosano com incorporação de micropartículas.....	16
3.4. Quantificação dos Compostos Fenólicos e Determinação e Determinação da Atividade Antioxidante.....	17

3.4.1. Quantificação de compostos fenólicos totais.....	17
3.4.2. Determinação da atividade antioxidante.....	19
3.5. Análise estatística	23
4. Resultados e Discussão	24
4.1.Caracterização dos Extratos Naturais	24
4.1.1. Determinação dos compostos fenólicos através do método direto	24
Determinação da atividade antioxidante.....	24
4.2.Caracterização das Micropartículas	25
4.2.1. Carregamento das micropartículas.....	25
4.2.2. Determinação da atividade antioxidante.....	26
4.3.Estabilidade da atividade antioxidante das películas	27
Conclusões	35
Sugestões de trabalho futuro	37
Bibliografia	38

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura molecular do quitosano	5
Figura 2 - Esquematização de Spray-Dryer..	13
Figura 3 - LabPlant SD-05 Spray-Dryer	13
Figura 4 - Curva de Calibração com Ácido Gálico para o método direto	17
Figura 5 - Curva de Calibração com Trolox para o método DPPH	20
Figura 6 - Curva de Calibração com Trolox para o método ABTS	22
Figura 7 - Curva de Calibração com Trolox para o método FRAP	23
Figura 8 - Cronograma de quantificações de atividade antioxidantes e incubações das películas.	28
Figura 9 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método DPPH para as películas de Alecrim em estudo.	29
Figura 10 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método DPPH para as películas de Chá-Verde em estudo.	29
Figura 11 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método ABTS para as películas de Alecrim em estudo.	30
Figura 12 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método ABTS para as películas de Chá-Verde em estudo.	31

Índice de tabelas

Tabela 1 – Exemplos de antioxidantes e sua origem (Xu et al., 2017)	6
Tabela 2 - Metodologias de extração de antioxidantes (Lourenço et al., 2019).....	8
Tabela 3 - Exemplos de matrizes utilizadas em microencapsulação na industrial alimentar (Shahidi and Han 2001).	10
Tabela 4 - Teor em inulina em diversos alimentos (Loo et al., 1995).....	11
Tabela 5 - Teor total de compostos fenólicos (expresso em mg de equivalentes de Ácido Gálico por g de extrato seco (mg EAG / g extrato seco)), Media ± Desvio-Padrão.	24
Tabela 6 – Valores de TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) para os extratos naturais (expresso em mmol Trolox por mg de equivalentes de ácido gálico (mmol Trolox / mg EAG)), Media ± Desvio-padrão.....	25
Tabela 7 – Teor total de compostos fenólicos (expresso em mg de equivalentes de Ácido Gálico por g micropartículas (mg EAG / g micropartículas)), Media.	26
Tabela 8 - Valores de TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) para as micropartículas (expresso em mmol Trolox por mg de micropartículas (mmol Trolox / mg micropartículas)), Media ± Desvio-padrão.....	27
Tabela 9 – Resumo das- atividades antioxidantes obtidas pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP para as películas de Alecrim e Chá-verde em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 ([mmol Trolox / mg película] x 10^5). Media ± Desvio-padrão. Q – Película com cápsulas de extrato adicionadas a 70 °C durante 5 minutos; A – Película com cápsulas de extrato adicionadas à temperatura ambiente; AL – Película com extrato não encapsulado. ...	34

Introdução e Objetivos

Com a crescente preocupação e procura por soluções alternativas aos plásticos tradicionais tem aumentado a utilização de materiais à base de biopolímeros naturais. A embalagem para alimentos deixou de ser apenas uma barreira inerte entre o género alimentício e o exterior. O material de embalagem em casos específicos pode conter compostos bioativos, que contribuem para o aumento da vida útil dos alimentos, conferindo proteção físico-química e/ou microbiológica.

As plantas aromáticas e o chá-verde são algumas das fontes de compostos bioativos passíveis de ser utilizados no desenvolvimento de embalagens bioativas.

Alguns dos compostos bioativos são instáveis quando submetidos ao processamento industrial, e a condições de transporte e armazenamento, com consequente impacto negativo nas suas propriedades. Um dos meios de proteção destes compostos e de forma a aumentar a sua estabilidade, que tem vindo a ser estudado é o processo de microencapsulamento. A técnica mais usualmente aplicada para o microencapsulamento é a secagem por atomização, sendo a sua utilização reportada na literatura para um vasto número de matrizes encapsulantes, como é o caso dos polissacáridos e proteínas. Estes materiais são utilizados para encapsular uma variedade de compostos bioativos com atividade antioxidante ou antimicrobiana.

O presente estudo teve como objetivo principal desenvolver um material de embalagem biodegradável e bioativo. Na prossecução do objetivo principal foram efetuados os seguintes estudos:

- Estudo de potencial antioxidante de extratos de alecrim e chá-verde;
- Microencapsulamento de extratos de alecrim e chá-verde;
- Estudo do potencial antioxidante das microcápsulas obtidas;
- Formulação de películas biodegradáveis de quitosano com incorporação de extratos na forma livre;
- Formulação de películas biodegradáveis de quitosano com incorporação de micropartículas com extratos encapsulados;
- Estudo do potencial antioxidante das películas biodegradáveis e bioativas;

- Estudo de estabilidade do potencial antioxidante das películas biodegradáveis.

O presente estudo é focado na avaliação do potencial antioxidante de extratos de alecrim e de chá-verde encapsulados numa matriz de inulina. Estas micropartículas associadas a uma embalagem biodegradável de quitosano tem como objetivo a proteção da oxidação de produtos alimentares através de uma embalagem biodegradável.

2. Enquadramento teórico

2.1. Embalagem para alimentos

Os materiais plásticos, derivados do petróleo, tornaram-se parte integrante da sociedade atual devido à sua versatilidade, durabilidade e baixo custo de produção. O uso destes materiais tem crescido de forma significativa ao longo dos anos e representando uma enorme importância na indústria alimentar onde os termoplásticos como polipropileno, polietileno e policloreto de vinilo são os mais utilizados no fabrico de embalagens (Marsh e Bugusu, 2007).

O consumo excessivo de materiais plásticos e de embalagens descartáveis tem levado a um acumular de resíduos plásticos no meio ambiente. Este acumular de resíduos tem gerado um impacto ambiental devido à sua lenta decomposição, e em certos casos à libertação de substâncias nocivas (Rodriguez et al, 2001).

Para reduzir o impacto negativo no meio ambiente a União Europeia tem promovido diversas estratégias, uma destas estratégias, de acordo com a diretiva Europeia *Embalagens e Resíduos de Embalagens*, revela como prioridade a prevenção de desperdícios de embalagens e assinala a importância da reutilização e reciclagem de forma a reduzir o volume de desperdícios, contudo estas medidas não têm sido suficientes para combater o problema exposto (Conselho Europeu, 2004; Rudnik, 2008).

Mais recentemente, e com a crescente consciencialização das comunidades para questões ambientais, tem sido estudadas as vantagens da utilização de embalagens biodegradáveis produzidas com macromoléculas naturais como alternativa as de plástico convencionais (Ponce et al., 2009).

2.1.1. Embalagens biodegradáveis e bioativas

Face as limitações da embalagem alimentar tradicional, onde a sua principal função é a criação de uma barreira inerte com o meio exterior, e com o objetivo de satisfazer as crescentes exigências do consumidor e da própria indústria surgiram as embalagens ativas. Estas embalagens, através da utilização e incorporação de novos materiais, desempenham, para além da função de barreira com o meio externo, funções de interação com o produto alimentar permitindo assim manter ou salientar

características organoléticas dos alimentos, adicionar características nutricionais ou aumentar o seu tempo de prateleira (Orts e Attila, 2013).

Reações oxidativas e contaminações microbianas são das causas mais registradas para a perda de qualidade e segurança nos alimentos tornando por isso importante a implementação de embalagens ativas que desempenhem funções antimicrobianas e antioxidantes em forma de prevenção e manutenção da qualidade alimentar. Para além destas funções podem ainda desempenhar funções de emissão ou absorção de diferentes gases como o oxigénio, o dióxido de carbono ou o etileno (L. Robertson, 2013).

As reações de oxidação nos alimentos podem afetar as características organoléticas (a rancificação ou escurecimento), as suas propriedades nutritivas, perda de vitaminas e de ácidos gordos essenciais, ou ainda originar a presença de compostos nocivos para a saúde humana. A incorporação de compostos com capacidades antioxidantes pode ser feita diretamente na matriz da embalagem impedindo assim a ocorrência de reações de oxidação ao reagirem estas com os radicais livres e peróxidos, aumentando assim o seu tempo de vida útil (Fátima et al., 2009; Portes et al., 2009)

A embalagem ativa tem sido produzida com a conjugação entre polímeros e substâncias ativas, permitindo assim a obtenção das propriedades desejadas para a sua possível aplicação. O uso de polímeros naturais como resinas, lípidos, proteínas ou polissacarídeos tem registado um aumento na indústria alimentar face ao crescente interesse por embalagens biodegradáveis, reduzindo assim o impacto ambiental gerado pelos plásticos tradicionais. O interesse nas embalagens ativas está também associado à sua versatilidade de aplicação, podendo estes materiais ser aplicados como embalagens ou como revestimentos (Arrieta et al., 2014; Pinheiro et al., 2010).

A crescente exigência por parte do consumidor por produtos naturais com um maior tempo de prateleira tem impulsionado a investigação de novos constituintes para as embalagens biodegradáveis e ativas. Um dos biopolímeros mais estudados para a obtenção de revestimentos e embalagens ativas biodegradáveis é o quitosano (Fai et al., 2008).

2.1.2. Materiais utilizados na produção de embalagens biodegradáveis e bioativas

Cada vez mais é possível encontrar estudos sobre a extração e aplicação de polímeros obtidos a partir de fontes renováveis na produção de embalagens biodegradáveis e bioativas. Estes polímeros naturais são abundantemente encontrados na natureza durante os ciclos de crescimento de organismos vivos e são chamados de biopolímeros. Na produção deste tipo de embalagens podem ser utilizados biopolímeros como quitosano (Durango et al., 2006), inulina (Cao et al., 2018), alginato (Millette et al., 2007), proteína de soja (Ko et al., 2001), carboximetilcelulose (Silva, 2015), goma arábica (Vigneshwaran et al., 2011) ou caseinato de sódio (Kristo et al., 2008).

Presente no exosqueleto dos crustáceos, insetos e na parede celular de fungos, a quitina é um biopolímero insolúvel e com exceção da celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza. Obtido através de uma reação de desacetilação da quitina a altas temperaturas temos o quitosano, de fórmula química $[C_6H_{11}O_4N]_n$, é um polímero natural, amino catiónico, composto por unidades β -1,4-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose, representado na figura 1.

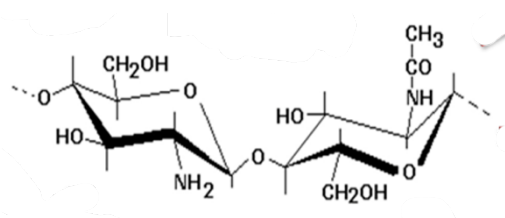


Figura 1 - Estrutura molecular do quitosano

A molécula de quitosano é constituída por três grupos funcionais: um grupo amina, na posição C-2, e dois grupos hidroxilo, nas posições C-3 e C-6. Qualquer alteração química nestes grupos confere diferentes características ao composto, tornando-o adequado para um amplo leque de aplicações (Shahidi et al., 1999).

O quitosano é um composto natural, de baixo custo e biodegradável, apresentando um grande potencial de produção de películas bioativas, não só pela sua biodegradabilidade, mas também pelas suas características antifúngicas, antimicrobianas e pela sua capacidade de formar películas transparentes e de elevada resistência. Este apresenta também uma permeabilidade seletiva aos gases (CO_2 e O_2) e boas propriedades mecânicas (Martínez-Camacho et al., 2010).

2.2. Extratos Naturais

Desde a antiguidade que se observa a utilização de plantas, das quais as aromáticas, para fins terapêuticos, como na medicina Chinesa e Indiana. É também possível observar a sua larga utilização na gastronomia, onde as suas características organoléticas são utilizadas para enaltecer os mais variados pratos ou completar diferentes dietas. Atualmente mais de 25 % dos produtos farmacêuticos tem na sua composição derivados de plantas devido as suas conhecidas propriedades (Andrade et al., 2018).

Extratos obtidos a partir de diversas plantas apresentam na sua constituição vários compostos ativos responsáveis por propriedades antioxidantes e antimicrobianas. A composição destes extratos pode variar de acordo com diferentes fatores, tais como, as condições geoclimáticas, o método de extração utilizado, o solvente de extração e da parte da planta que é feita a extração (Dvaranauskaite et al., 2009). Na tabela 1 estão exemplos de compostos ativos e a sua origem.

Tabela 1 – Exemplos de antioxidantes e sua origem (Xu et al., 2017) .

Origem	Compostos Ativos
Funcho	Compostos fenólicos
Lichia	Compostos fenólicos
Chá-verde	Polifenóis
Tomate	Carotenóides
Colza	Polifenóis; vitamina E e B
Alecrim	Compostos fenólicos
Azeitona	Polifenóis; Ácido ascorbico
Papaia	Licopeno
Uva	Flavonoides
Rosmaninho	Polifenóis
Cássia	Compostos fenólicos

Os antioxidantes naturais das plantas estão cada vez mais a tornar-se importantes, não só na indústria farmacêutica, mas também na indústria alimentar, onde já é possível encontrar os extratos de rosmarinho e de goma de cássia como autorizados como um aditivo natural pela Comissão Europeia (Diretiva 2010/67/EU e 2010/69/EU).

2.2.1. *Rosmarinus officinalis* L.

O *Rosmarinus officinalis* L., mais conhecido por alecrim, é planta aromática da família *Lamiaceae*, uma espécie original de países da região Mediterrânea e atualmente cultivado na sua maioria em terrenos arenosos e próximos do mar. O alecrim é um arbusto que pode atingir 2 metros de altura, cuja parte aérea é composta por folhas estreitas e coriáceas de cor verde. Esta planta aromática tem sido amplamente utilizada, não apenas na culinária para modificar e aprimorar os sabores, mas também como uma fonte de compostos bioativos devido a características como a atividade antibacteriana, antidiabética, anti-inflamatória e antioxidante (Laura et al., 2010).

A família *Lamiaceae* tem sido estudada devido ao seu alto teor compostos fenólicos. No alecrim o ácido rosmarínico é o maior responsável pelo poder antioxidante. Também presente no alecrim estão compostos como o ácido carnósico e o carnosol, cuja concentração é fortemente influenciada por fatores endofoclimáticos (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016; Bozin et al., 2007).

2.2.2. *Camellia sinensis* L.

A planta de chá, de nome científico *Camellia sinensis* L., é uma planta arbustiva, de folha simples e coriácea e pode atingir 2 metros de altura, pertence à família *Theaceae*, de origem asiática e é cultivada em todo o mundo, onde a China, o Japão e a Índia são classificados como os maiores produtores. Na Europa, e devido a fatores endofoclimáticos como a altitude, humidade, temperatura e acidez de solo apenas é possível encontrar produções deste arbusto na ilha de São Miguel, Açores, Portugal (Baptista et al., 2012; Dufresne e Farnworth, 2001; Moderno et al., 2012).

O chá *Camellia sinensis* L. pode ser classificado consoante o tipo de fermentação oxidativa a que as folhas do arbusto são sujeitas. Assume-se a classificação de chá-verde quando não é feita qualquer fermentação, conservando assim a cor verde natural das folhas, de chá-oolong quando ocorre uma fermentação parcial e chá-preto, quando o processo fermentativo é mais intenso, alterando assim a coloração das folhas e o seu sabor (Moderno et al., 2012).

O consumo dos diferentes tipos de chá derivados de *Camellia sinensis* está frequentemente associado às suas propriedades antioxidantes. Um número crescente

de estudos tem sido realizado na tentativa de melhor entender os mecanismos de ação dos antioxidantes, os benefícios associados à capacidade antioxidante e a melhor maneira de otimizar estas propriedades. Investigações relacionadas ao consumo ideal de chá-verde sugerem que pode ter um efeito benéfico na saúde humana onde os compostos fenólicos com maior concentração são o ácido gálico, a galocatequina, a catequina, a epicatequina e a epigallocatequina (FORESTER e LAMBERT, 2013).

2.2.3. Métodos de obtenção de extratos

Como referido anteriormente, muitos antioxidantes naturais podem ser encontrados em matrizes vegetais, sendo necessária a sua extração para posteriormente serem utilizados. A qualidade destes compostos não só depende da sua origem, folhas, raízes, frutas, sementes ou polpas, mas também da metodologia utilizada para a sua extração. Não existe uma metodologia de extração universal pois, cada composto, apresenta propriedades físicas e químicas únicas, podendo assim tornar ineficiente a utilização de apenas uma metodologia para uma variedade de compostos e matrizes. Na tabela 2 encontram-se representados diferentes processos de extração para diversos antioxidantes.

Tabela 2 - Metodologias de extração de antioxidantes (Lourenço et al., 2019)

Metodologia	Origem	Antioxidante
Extração por Solventes Orgânicos	Folhas cafeeiro	Carotenoides; Clorofila
	Batata doce	Polifenóis; Antocianinas
	Dreche	Compostos fenólicos
	Banana	Flavonoides
	Casca de ananás	Polifenóis
	Pêssego	Flavonoides; Compostos fenólicos
Extração por Altas Pressões Hidrostáticas	Polpa de Tomate	Licopeno; Flavonoides
	Murta-comum	Antocianinas; Ácido fenólico
	Maçã	Compostos fenólicos

Metodologia	Origem	Antioxidante
Extração por Ultrassons	Mirtilo	Compostos fenólicos
	Manga	Pectina; Compostos fenólicos
	Folhas de medronheiro	Antocianinas
Extração assistida por micro-ondas	Romã	Compostos fenólicos
	Folhas de oliveira	Compostos fenólicos

2.3. Encapsulamento de compostos bioativos

Com a crescente tendência por parte dos consumidores em requererem alimentos, que além das suas funções nutricionais básicas, também consigam oferecer efeitos positivos na saúde, surgiram os chamados alimentos funcionais (Champagne e Fustier, 2007). Muitas destas características desejadas pelos consumidores nos alimentos funcionais advêm da incorporação de compostos bioativos como antioxidantes, compostos fenólicos, vitaminas, óleos essenciais ou outros, contudo estes compostos podem ser muito sensíveis e instáveis a todos os processos a que são submetidos, desde o processamento até ao seu armazenamento onde fatores como a luz, temperatura e presença de oxigénio têm um impacto negativo nas suas propriedades (Champagne e Fustier, 2007; Kris-Etherton et al., 2002).

A fim de reduzir a degradação a que os compostos bioativos estão sujeitos surgiu uma nova estratégia, a microencapsulação (Gouin, 2004; Loksuan, 2007). Este processo de microencapsulação promove a criação de estruturas onde um determinado composto bioativo com características específicas, o núcleo, é revestido por uma matriz, também chamada de material de parede, conferindo assim uma proteção físico-química (Campos et al., 2013).

O processo de encapsulação apresenta diversas vantagens na indústria alimentar devido a razões como a possibilidade de libertação controlada dos materiais encapsulados, a proteção dos compostos bioativos contra as reações de degradação promovidas por fatores externos, a dissimulação de características organolépticas não desejadas ou a estabilização de ingredientes de forma a aumentar a sua estabilidade durante o armazenamento (Anal e Singh, 2007; Gharsallaoui et al., 2007).

2.3.1. Materiais de Parede de Encapsulamento

Existem diversos materiais disponíveis para constituírem o material de parede no microencapsulamento. Contudo, na indústria alimentar estes materiais tem que ser reconhecidos e aprovados como seguros para a alimentação humana, limitando assim a escolha dos mesmos. A matriz deve também ter características específicas como permitir soluções ou suspensões de baixa viscosidade em concentrações elevadas, elevada solubilidade em água, boas propriedades emulsionantes, baixa higroscopicidade, boa capacidade de proteção do núcleo, apresentarem propriedades organoléticas desejáveis e baixo custo (Loksuwan, 2007; Shahidi e Han, 2001).

As matrizes de encapsulação podem ser compostas por diversos materiais tais como hidratos de carbono, lípidos ou proteínas, tal como representado na tabela 3.

Tabela 3 - Exemplos de matrizes utilizadas em microencapsulação na industrial alimentar (Shahidi and Han 2001).

Classe de Compostos	Exemplos
Polissacarídeos	Dextrina; amido; sacarose; inulina; celulose
Lípidos	Cera de abelha; gorduras, óleos; parafina; monoglicerídeos
Proteínas	Albumina; caseína; gelatina; glúten

Uma escolha ponderada da matriz de microencapsulamento é essencial pois será esta que irá determinar as condições ambientais específicas a que as micropartículas poderão ser sujeitas, isto é, a matriz irá determinar a que parâmetros de pH, temperatura ou luminosidade, no que respeita a estabilidade e a libertação dos compostos bioativos microencapsulados.

Inulina

Presente na alimentação diária a inulina é um polissacarídeo de reserva e pode ser encontrado numa variedade de plantas de interesse económico como representado na tabela 4, onde a nível industrial a chicória é a mais utilizada para a extração respetiva. Esta é uma fibra dietética solúvel e não dirigível, apresentando um sabor adocicado com baixo valor calórico (1,2 Kcal / g) e uma aparência de pó branco e inodoro (Fernandes et al., 2014; Loo et al., 1995).

Tabela 4 - Teor em inulina em diversos alimentos (Loo et al., 1995)

Alimento	Teor em inulina (% m/m)
Alho Francês (<i>Allium ampeloprasum</i>)	16 - 20
Chicória (<i>Cichorium intybus</i>)	15 - 20
Alho (<i>Allium sativum</i>)	9 - 16
Alcachofra (<i>Helianthus ampelaprasum</i>)	3 - 10
Cebola (<i>Allium cepa</i>)	1 - 8
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	1 - 4
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	0,5 – 1,5
Banana (<i>Musa cavendishii</i>)	0,3 – 0,7

Em termos químicos a inulina é um polímero, cujo grau de polimerização pode variar entre 10 e 60 unidades de frutose unidas por ligações β -(2,1)-frutofuranosídicas, tendo um grau de polimerização medio de 25 unidades, podendo este mudar de acordo com a origem (Franck, 2002).

Na industria alimentar a inulina pode ser utilizada como agente gelificante, na substituição de gorduras, também na estabilização de espumas e emulsões ou como descrito por (Beirão-da-Costa et al., 2013; Fernandes et al., 2014) como matriz no encapsulamento de diversos compostos.

2.3.2. Processos de Microencapsulação

A microencapsulação é um processo em que pequenas partículas de líquido são revestidas por um material polimérico, as quais são chamadas microcápsulas. Este processo permite que compostos ativos, como antioxidantes, fiquem protegidos das condições adversas do meio exterior pelo material de revestimento. Estas micropartículas podem apresentar diferentes morfologias, que dependem não só do material de revestimento, mas também do composto ativo e da técnica de microencapsulação utilizada. É possível encontrar diversos estudos que relatam diferentes metodologias de microencapsulação, como o freeze-drying, coacervação ou spray-drying, que permitem o encapsulamento de compostos bioativos.

A microencapsulação por freeze-drying é um processo no qual uma solução de alimentação contendo o material de revestimento e o composto bioativo é atomizada e congelada a temperaturas inferiores a -40 °C e a reduzidas pressões. Esta técnica

revela-se eficaz para a microencapsulação de material biológico sensível ao calor e à oxidação, como compostos fenólicos e antioxidantes. Contudo, quando comparada com outras metodologias, apresenta desvantagens consideráveis como o elevado custo de operação e a longa duração do procedimento.

A coacervação é um processo no qual ocorre a separação, induzida por uma alteração de força iónica, de pH, ou de solubilidade, de uma solução aquosa coloidal, resultando em duas fases líquidas, sendo uma destas fases rica em polímeros. O processo de coacervação tem sido apresentado como uma possibilidade para a microencapsulação de diferentes compostos instáveis, como carotenoides, compostos fenólicos ou bactérias probióticas (Corrêa-Filho et al., 2019).

De entre a vasta gama de técnicas de encapsulamento a tecnologia de secagem por atomização, também conhecida por spray-drying, é a mais amplamente utilizada devido à sua flexibilidade e ao método de operação contínuo, e também por ser a mais económica quando comparada com as outras metodologias disponíveis (Fernandes et al., 2013; Gharsallaoui et al., 2007).

Esta tecnologia consiste em dissolver, dispersar ou emulsionar compostos ativos numa solução aquosa juntamente com a matriz de encapsulação escolhida seguindo de uma atomização e secagem com ar a elevadas temperaturas de forma a se obter um material em pó. Assim, esta técnica envolve a combinação de várias fases, incluindo atomização, mistura com o ar quente, a evaporação e a separação do produto final.

As figuras 2 e 3 representa o esquema e o princípio do equipamento de secagem utilizado. No presente estudo a solução de alimentação passa através de um pequeno orifício a uma pressão elevada sendo atomizada em pequenas gotas numa câmara de secagem promovendo a rápida evaporação do solvente. Sendo formadas películas na superfície das gotas e consequentemente a solidificação das mesmas. As partículas mais densas são recolhidas no fundo da câmara de secagem e posteriormente descartadas, as mais finas são recolhidas no coletor de amostra e nas paredes do ciclone.

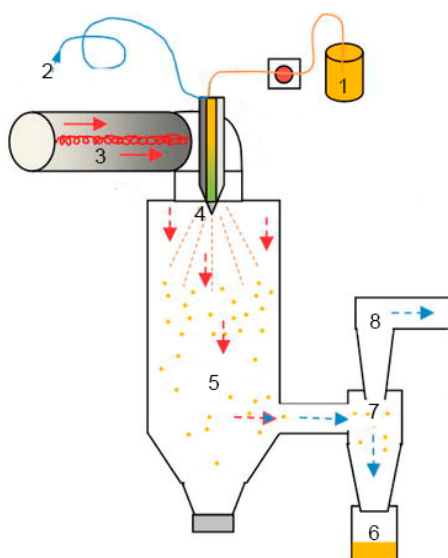


Figura 3 - Esquemática de Spray-Dryer. 1 – Solução de alimentação; 2 – Entrada de ar comprimido; 3 – Entrada de ar quente; 4 – Atomizador; 5 – Câmara de secagem; 6 – Coletor de amostra; 7 – Ciclone; 8 – Saída



Figura 3 - LabPlant SD-05 Spray-Dryer

O contacto entre o ar de secagem e as gotas pulverizadas pode ser efetuado de três maneiras, co-corrente, contracorrente ou de fluxo misto. No presente estudo foi utilizado o contacto co-corrente, onde o ar quente e as gotas pulverizadas entram na camara de secagem no mesmo sentido, este é o método preferencial para compostos sensíveis ao calor, uma vez que a evaporação ocorre rapidamente e as partículas secas são expostas a temperaturas mais moderadas (Gharsallaoui et al., 2007).

Alem do sentido da corrente do ar de secagem existem também outros fatores determinantes que afetam a estrutura das micropartículas resultantes. Fatores relacionados com a solução de alimentação como a razão entre material de núcleo e o material de parede, a concentração do material de parede, a viscosidade da solução ou a temperatura da mesma. Devem também ser consideradas as condições de atomização como o diâmetro do atomizador, a pressão e temperatura do ar e a velocidade de atomização da solução de alimentação. A conjugação destes fatores é determinante para se obter um produto final de qualidade, onde o tamanho, distribuição, densidade, massa e teor de humidade das partículas estão de acordo com os padrões desejados (Estevinho et al., 2013; Yeo, 2005).

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação dos extratos

Os extratos do Alecrim (Portugal, Terra-Pura) e do Chá-Verde (Açores, Encosta da Bruma - Gorreana) foram obtidos através de uma extração sólido-líquido, usando etanol a 99,8 % (Sigma Aldrich, USA) como solvente.

O processo de extração foi realizado com 10 mL de etanol por 1 g de matéria-prima, sob forte agitação magnética, durante 30 minutos, na ausência de luz e à temperatura ambiente. Após o contacto os extratos etanólicos foram separados por filtração sob vácuo. O permeado foi recolhido e armazenado a 4 °C e na ausência de luz para posterior caracterização.

3.2. Microencapsulação dos Extratos Naturais

3.2.1. Preparação das soluções de alimentação

Soluções para micropartículas de inulina com extrato

Dissolveu-se, sob agitação, 12 g de inulina em 60 g de água destilada pré-aquecida (70-80 °C). Simultaneamente dissolveu-se 1,2 g de extrato em 22,8 g de etanol a 60 %. Em seguida preparou-se uma solução com 20 g de água destilada e 24 g de solução etanólica de extrato, deixando-se sob agitação magnética até homogeneização.

Posteriormente, à temperatura ambiente, adicionou-se a solução com extrato etanólico à solução de inulina, e deixou-se sob agitação magnética durante 10 minutos. Assim, a solução final contém com 10% (m/m) de extrato em relação à inulina.

Soluções para micropartículas de inulina sem extrato

As soluções para produção de micropartículas de inulina sem extrato foram obtidas de forma semelhante à anteriormente descrita, contudo não se adicionou extrato à solução etanólica.

3.2.2. Condições do processo de secagem

As condições utilizadas para secagem por atomização das partículas de inulina, com e sem extrato natural, foram as descritas por Beirão-da-Costa et al., 2013 com algumas modificações.

As soluções descritas anteriormente foram alimentadas com um caudal de 3,3 mL/min a um spray dryer (LabPlant, SD-05) equipado com um nozzle com 0,5 mm de diâmetro. Utilizou-se com ar de secagem a uma temperatura de entrada de 190 °C e a uma temperatura de saída de 73 °C, circulando em co-corrente.

3.3. Preparação das Películas

3.3.1. Películas de quitosano sem incorporação micropartículas

A solução filmogénica base é idêntica para todas as películas em estudo, diferindo apenas no tipo de partículas incorporadas. A solução filmogénica tem por base quitosano e glicerol (Sigma Aldrich, USA).

Inicialmente preparou-se uma solução de ácido láctico a 1% e, sob agitação, dissolveu-se o quitosano (2% m/m), a uma temperatura de 70°. Após 3 horas, sob agitação, foi adicionado o glicerol (25 % m/m em relação ao quitosano), e deixando-se sob agitação até atingir a temperatura ambiente.

Para a obtenção de películas de quitosano sem a incorporação de micropartículas, a solução filmogénica foi colocada numa câmara de vácuo durante 10 minutos de forma a remover as bolhas de ar presentes na mesma. Posteriormente foi transferida uma massa de 15 g de solução para placas de petri de 90 mm de diâmetro, levando-se a secar numa câmara de temperatura controlada (Aralab, FITOCLIMA 750E) durante 24 horas, a 40 °C, com ventilação.

3.3.2. Películas de quitosano com incorporação de micropartículas

De forma semelhante à descrita anteriormente, e partindo da solução filmogénica base, fez-se variar o tipo de partículas incorporadas e a temperatura a que se realizou essa incorporação, originando assim 8 soluções filmogénicas diferentes:

- solução filmogénica base + micropartículas de inulina sem extrato (T ambiente);
- solução filmogénica base + micropartículas de inulina sem extrato (70 °C);
- solução filmogénica base + micropartículas com extrato de alecrim (T ambiente);
- solução filmogénica base + micropartículas com extrato de alecrim (70 °C);
- solução filmogénica base + micropartículas com extrato de chá-verde (T ambiente);
- solução filmogénica base + micropartículas com extrato de chá-verde (70 °C);
- solução filmogénica base + extrato de alecrim livre;
- solução filmogénica base + extrato de chá-verde livre.

As soluções filmogénicas com adição de micropartículas foram obtidas através da adição do equivalente de micropartículas necessário para se obter 1,84 mg EAG por grama de solução. A adição das micropartículas à solução filmogénica foi efetuada a duas temperaturas diferentes, à temperatura ambiente e a 70 °C durante 5 minutos, sob agitação magnética até se obter uma mistura homogénea. Elaborou-se também películas com extrato na forma livre, respeitando-se a metodologia acima descrita e à temperatura ambiente.

As etapas de redução de bolhas de ar e de secagem das soluções filmogénicas ocorreram de forma idêntica à das soluções filmogénicas sem incorporação de amostra.

3.4. Quantificação dos Compostos Fenólicos e Determinação e Determinação da Atividade Antioxidante

3.4.1. Quantificação de compostos fenólicos totais

- Extratos etanólicos

Na quantificação dos compostos fenólicos totais, para os extratos etanólico, efetuou-se a leitura direta da absorvância a 280 nm, utilizando-se 3,5 mL de extrato numa cuvette de quartzo. As leituras foram efetuadas utilizando um espectrofotómetro UV/VIS (GBC, 916).

A curva de calibração, figura 4, foi obtida respeitando o procedimento acima descrito, contudo em vez de amostra foram utilizadas diferentes concentrações de ácido gálico (*Sigma Aldrich, USA*).

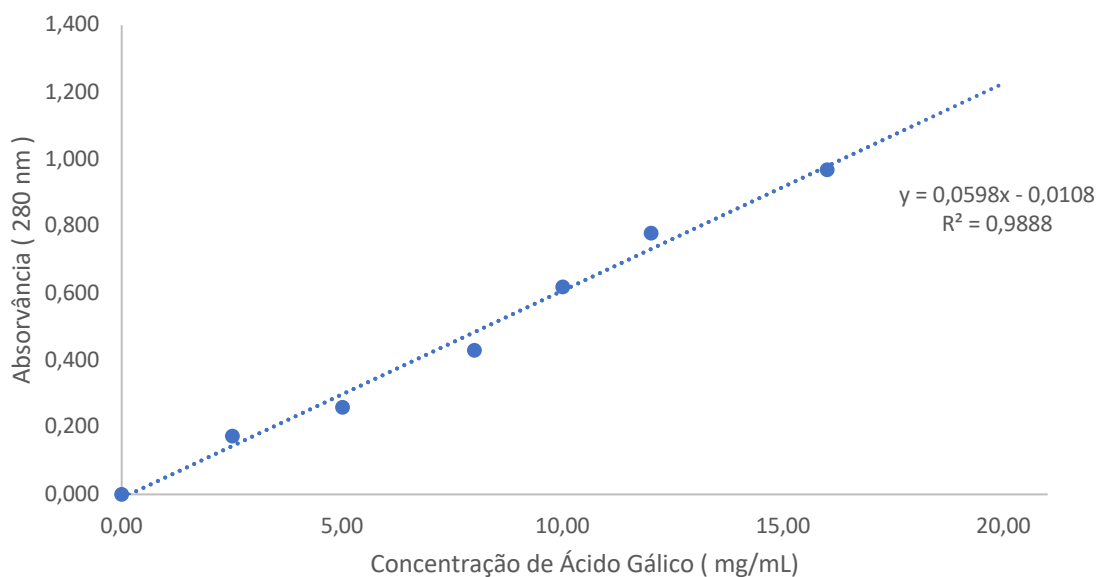


Figura 4 - Curva de Calibração com Ácido Gálico para o método direto

- Micropartículas com extrato

Para a quantificação dos compostos fenólicos nos extratos microencapsulados testou-se três metodologias diferentes:

- Extração com etanol (PE);
- Extração em ultra-turrax das micropartículas em etanol (PU);
- Dissolução das micropartículas em água a 70 °C (PQ).

Para a metodologia de extração das micropartículas em etanol efetuou-se o contacto de 50 mg de micropartículas com 10 mL de etanol (Sigma Aldrich, USA). A suspensão foi vigorosamente homogeneizada com o auxílio de um vortex até se obter uma suspensão homogênea. Em seguida efetuou-se a filtração da suspensão com recurso a um filtro de seringa de membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm (GVS, CA 0,45 µm). Efetuou-se a medição a uma absorvância a 280 nm, utilizando-se 3,5 mL de filtrado numa cuvette de quartzo. As medições foram efetuadas utilizando um espectrofotómetro *UV/VIS* (GBC, 916).

Em paralelo, e com base numa suspensão de micropartículas em etanol igual à anteriormente descrita efetuou-se à homogeneização da suspensão num homogeneizador ultra-turrax (IKA Labortechnik, T25 Basic) a 13500 rpm durante 1 minuto, com o objetivo romper as micropartículas. Após a homogeneização, a suspensão foi reservada durante 12 horas à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após esse período procedeu-se à filtração e medição de absorvância de forma análoga à anteriormente descrita.

Efetuiu-se também a adição de 50 mg de micropartículas a 10 mL de água destilada, previamente aquecida a 70 °C. Deixou-se esta solução a 70 °C durante 5 minutos e, sob agitação magnética constante, levou-se à temperatura ambiente. Após a estabilização da temperatura efetuou-se a filtração da suspensão e à medição de absorvância, utilizando-se o procedimento previamente descrito.

A quantificação do teor de compostos fenólicos nas micropartículas permitirá também a possibilidade de determinação do carregamento das películas, isto é, o conhecimento das mg de equivalentes de ácido gálico por mg de micropartículas para cada um dos extratos. Conhecendo o valor do carregamento, será possível calcular a

quantidade de micropartículas a se usar na formulação de películas, de forma a conseguir-se a formulação de películas uniformizada em termos de mg de equivalentes de ácido gálico por unidade de massa de película.

3.4.2. Determinação da atividade antioxidante

Atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

Preparou-se inicialmente uma solução de stock de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (*Sigma Aldrich, USA*) em metanol com uma concentração de 240 mg/mL e armazenou-se a -20 °C.

A solução diária foi preparada diluindo a solução de stock em metanol de forma a se obter uma solução de concentração 48 mg/mL. Posteriormente efetuou-se a medição da absorvância a 515 nm no espectrofotómetro (GBC UV/VIS 916), contra metanol, e quando necessário a solução foi diluída até se obter uma absorvância inferior a 1.1.

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos, adicionou-se num tubo de ensaio 100 µL de extrato a 3900 µL de solução diária, agitando-se ligeiramente e deixando-se incubar durante 40 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após esse período, mediu-se a absorvância a 515 nm, cada amostra foi analisada em triplicado.

No caso de determinação de atividade antioxidante em micropartículas utilizou-se o mesmo procedimento, diferindo apenas na adição de 100 µL das soluções preparadas no ponto 3.4.1, soluções PE, PU e PQ, em alternativa aos 100 µL de extrato.

Para a quantificação da atividade antioxidante em películas, seguindo-se a metodologia anteriormente descrita, utilizou-se aproximadamente 20 mg de película em substituição dos 100 µL de extrato.

O valor de “Radical Scavenging Activity” (RSA) foi calculado através da equação 1,

$$RSA (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{Amostra}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (1)$$

onde A_{DPPH} é a absorvância de uma solução 3900 μL de solução diária com 100 μL de metanol, e $A_{Amostra}$ a absorvância da amostra em estudo.

A atividade antioxidante foi expressa em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity), em [mmol Trolox / mg EAG] no caso dos extratos, em [mmol Trolox / mg micropartículas] no caso das micropartículas e em [mmol Trolox / mg película] para as películas.

Utilizando-se o procedimento acima descrito, efetuou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de reagente Trolox (Sigma Aldrich, USA), com concentrações compreendidas entre 100 – 2000 μM Trolox. A curva de calibração é apresentada com os valores de RSA (%) por concentração em molaridade de Trolox.

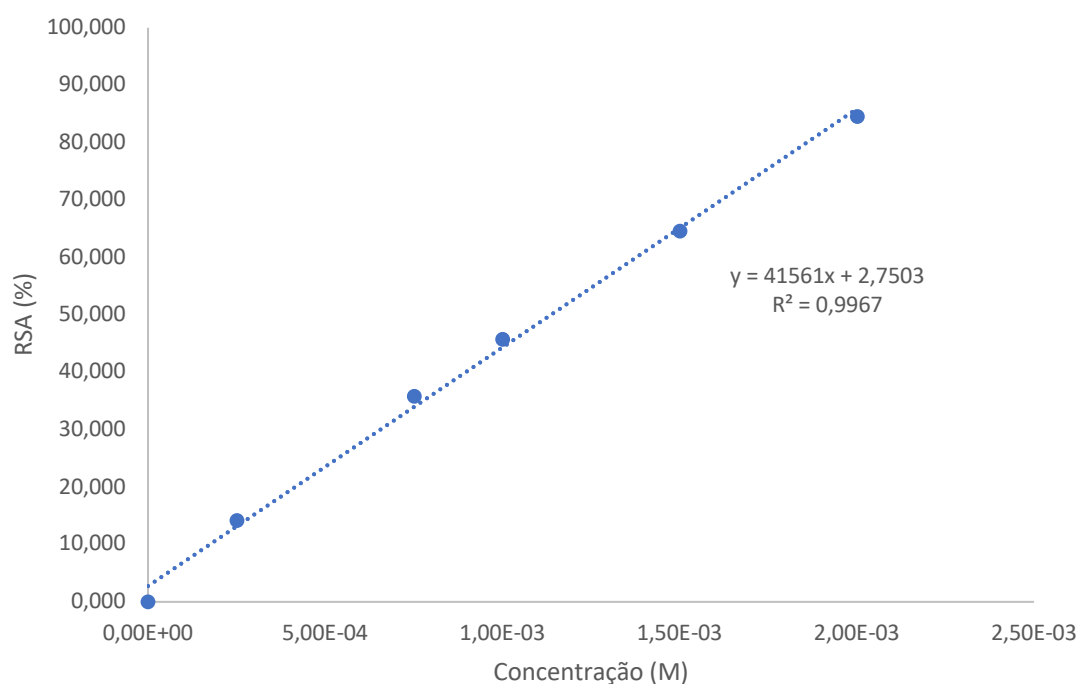


Figura 5 - Curva de Calibração com Trolox para o método DPPH

Atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS^{•+}

Para a determinação da atividade antioxidante preparou-se antecipadamente uma solução de radical livre de ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) (Sigma Aldrich, USA), onde foi diluído 70,4 µL de solução de persulfato de potássio a 140 mM em 4 mL de solução ABTS 7 mM, esta solução foi armazenada na ausência de luz e á temperatura ambiente durante 12 a 16 horas. A solução anteriormente preparada foi então diluída em etanol de modo a se obter uma absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm.

Após a homogeneização, num tubo de ensaio, de 30 µL de extrato, em 3 mL de solução radical ABTS^{•+}, a solução foi incubada durante 6 minutos, na ausência de luz e a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação foi medida a absorvância a 734 nm e calculado o RSA (%). As amostras foram lidas em triplicado.

No caso de determinação de atividade antioxidante em micropartículas utilizou-se o mesmo procedimento, diferindo apenas na adição de 30 µL das soluções preparadas no ponto 3.4.1, soluções PE, PU e PQ, em alternativa aos 30 µL de extrato.

Para a quantificação da atividade antioxidante em películas, seguindo-se a metodologia anteriormente descrita, utilizou-se aproximadamente 20 mg de película em substituição dos 30 µL de extrato.

O RSA (%) foi calculado através da seguinte equação 2,

(2)

$$RSA (\%) = \frac{A_{ABTS} - A_{Amostra}}{A_{ABTS}} \times 100$$

onde A_{ABTS} é a absorvância de uma solução 3000 µL de solução radical ABTS^{•+} com 30 µL de etanol, e $A_{Amostra}$ a absorvância da amostra em estudo.

Utilizando-se o procedimento acima descrito, efetuou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações, entre 250 - 2000 µM, de reagente Trolox. A

curva de calibração é apresentada com os valores de RSA (%) por concentração em molaridade de Trolox.

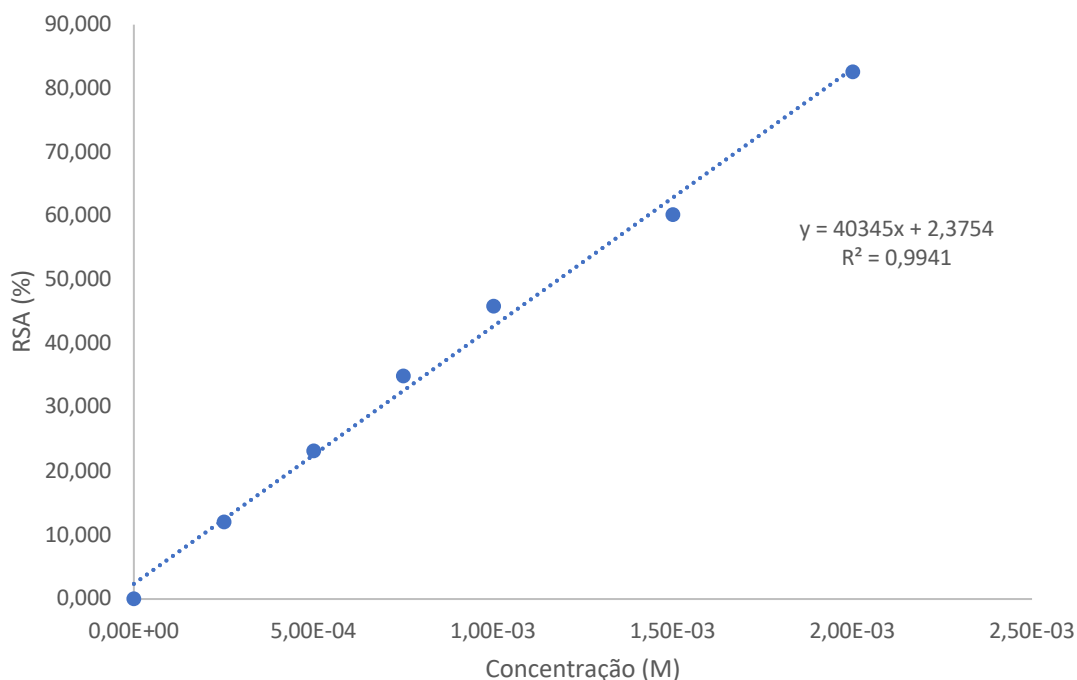


Figura 6 - Curva de Calibração com Trolox para o método ABTS

Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)

Preparou-se inicialmente uma solução de reagente FRAP (poder antioxidante redutor férrico), solução esta obtida através da homogeneização de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, com 2,5 mL de solução TPTZ (Thermo Fisher Scientific, UK) 10 mM e 2,5 mL de solução de cloreto férrico 20 mM (Panreac, UE). Em seguida adicionou-se, num tubo de ensaio, 90 µL de extrato, 270 µL de água nanopura, 60 µL de metanol e 2,7 mL de solução de reagente FRAP. Homogeneizou-se a solução num vortex e deixou-se a incubar durante 30 minutos, a 37°C com agitação e na ausência de luz. As amostras foram lidas em triplicado.

No caso de determinação de atividade antioxidante em micropartículas utilizou-se o mesmo procedimento, diferindo apenas na adição de 90 µL das soluções preparadas no ponto 3.4.1, soluções PE, PU e PQ, em alternativa aos 90 µL de extrato.

Para a quantificação da atividade antioxidante em películas, seguindo-se a metodologia anteriormente descrita, utilizou-se aproximadamente 20 mg de película em substituição dos 90 µL de extrato.

Utilizando-se o procedimento acima descrito, elaborou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de reagente Trolox (Sigma Aldrich).

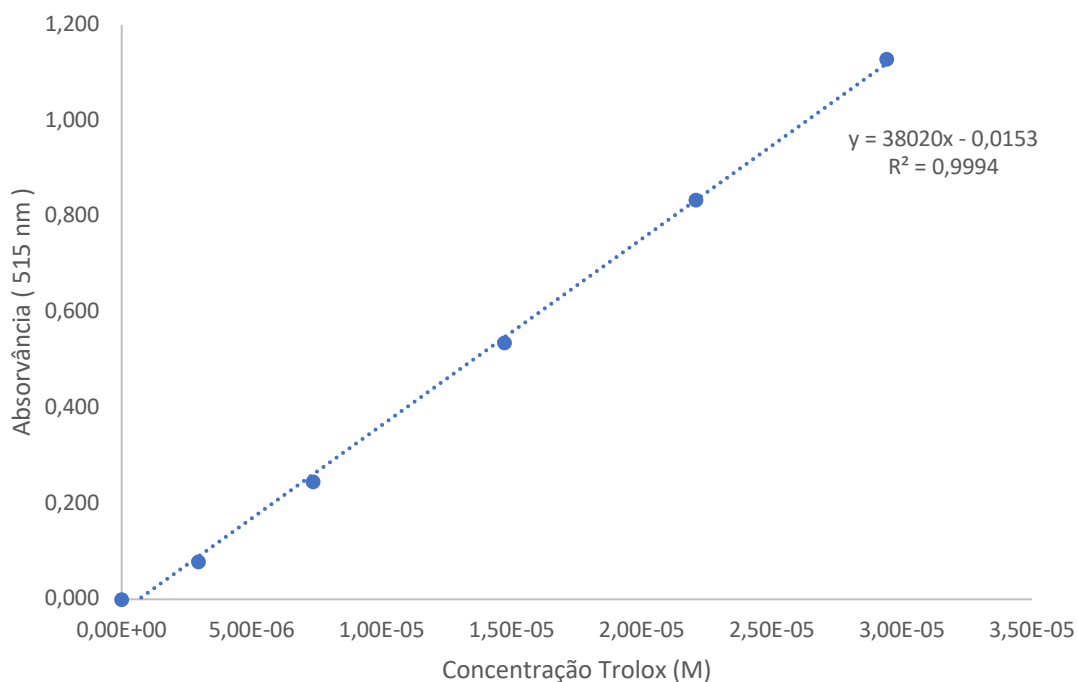


Figura 7 - Curva de Calibração com Trolox para o método FRAP

3.5. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o *Software Statistica Inc.*, v.8.0 da Statsoft (2007).

Todas as repetições de cada amostra estudada foram submetidas a uma análise estatística com o objetivo de analisar a variação de cada variável e rejeitar outliers, calculando assim o valor médio para cada amostra.

Para avaliar as diferenças entre cada película, nos diferentes parâmetros estudados, foi realizado o teste de *Tukey HSD* (valor de $p < 0,05$) para comparar as respetivas médias obtidas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos Extratos Naturais

4.1.1. Determinação dos compostos fenólicos através do método direto

A determinação dos compostos fenólicos totais foi efetuada através do método de análise direto onde, o teor em compostos fenólicos foi calculado através da equação obtida por regressão linear (Figura 4), $y = 0,0588x - 0,0182$, com o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9972$ e com concentrações entre 0 – 40 mg/L, expressa em mg EAG/ g extrato, presente na tabela 5.

Tabela 5 - Teor total de compostos fenólicos (expresso em mg de equivalentes de Ácido Gálico por g de extrato seco (mg EAG / g extrato seco)), Média \pm Desvio-Padrão.

Compostos Fenólicos Totais (mg EAG / g extrato)	
Alecrim	Chá-verde
5,35 \pm 0,41	162,87 \pm 2,37

Foi observado que extratos de chá-verde apresentam valores significativamente superiores de compostos fenólicos quando comparados com os extratos de alecrim. Esta conclusão é também corroborada com a literatura, (Castro et al., 2019; Lorenzo et al., 2014), onde resultados similares são apresentados.

4.1.2. Determinação da atividade antioxidante

Para a determinação e comparação das atividades antioxidantes dos extratos de alecrim e de chá-verde foram feitos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP, estando os resultados obtidos representados na tabela 4. Os valores representados na tabela são expressos em TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) e expressos em mmol de Trolox por mg de equivalentes de ácido gálico (mmol Trolox / mg EAG). Os valores de TEAC indicam a massa de composto bioativo necessária para se obter a mesma atividade antioxidante com 1 mmol de Trolox.

Tabela 6 – Valores de TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) para os extratos naturais (expresso em mmol Trolox por mg de equivalentes de ácido gálico (mmol Trolox / mg EAG)), Média \pm Desvio-padrão.

	TEAC (mmol Trolox / mg EAG)	
	Alecrim	Chá-verde
DPPH	4,71 \pm 0,450	0,64 \pm 0,030
ABTS	7,84 \pm 1,310	2,39 \pm 0,790
FRAP	0,13 \pm 0,010	0,02 \pm 0,002

Observando a tabela 6 podemos analisar que o extrato de chá-verde apresenta, para todas as metodologias aplicadas, um valor de TEAC menor e consequentemente uma menor atividade antioxidante quando comparado com o extrato de alecrim.

Foi observado que diversos estudos apresentam os resultados da atividade antioxidante em diferentes unidades, impossibilitando assim a comparação direta dos mesmos. Quando analisados os resultados obtidos por *Castro et al. (2019)* conclui-se que, embora em diferentes unidades, os extratos de chá-verde apresentam um poder antioxidante superior aos dos extratos de alecrim

Na tabela 6 é também possível observar uma diferença dos resultados entre as três metodologias analisadas. Esta diferença não é uma surpresa devido ao facto de cada uma destas se basear em diferentes princípios. *Dudonné et al (2009)* mostra que um único método de teste é insuficiente para estimar a atividade antioxidante, pois cada método mede a capacidade de sequestro de radicais específicos, recomendando assim a combinação de várias metodologias para avaliar corretamente a atividade antioxidante.

4.2. Caracterização das Micropartículas

4.2.1. Carregamento das micropartículas

Para a verificação do grau encapsulamento das micropartículas foram testadas três metodologias diferentes, tendo por base o método direto, para a quantificação dos compostos fenólicos presentes nas mesmas.

Na tabela 7 encontram-se representados os valores de fenólicos obtidos para micropartículas extraídas em etanol com recurso a ultra-torrax (PU), micropartículas extraídas em etanol (PE) e micropartículas extraídas em água a 70 °C durante 5 minutos (PQ).

Tabela 7 – Teor total de compostos fenólicos (expresso em mg de equivalentes de Ácido Gálico por g micropartículas (mg EAG / g micropartículas)), Média.

	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG / mg micropartículas)		
	PU	PE	PQ
Alecrim	$3,37 \times 10^{-3}$	$2,63 \times 10^{-3}$	$7,66 \times 10^{-3}$
Chá-verde	$3,13 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$	$1,45 \times 10^{-2}$

Analisando os valores apresentados na tabela 7 é possível verificar que a metodologia envolvendo a dissolução das micropartículas em água a 70 °C durante 5 minutos apresenta maiores teores de compostos fenólicos. Isto pode dever-se ao facto do material de parede se dissolver melhor a temperaturas mais elevadas, libertando assim mais compostos para a solução.

Considerando-se os valores obtidos para as micropartículas dissolvidas em água a 70 °C durante 5 minutos, estabeleceu-se a adição de 1,84 mg EAG por grama de película, no procedimento de preparação de películas bioativas.

4.2.2. Determinação da atividade antioxidante

Os resultados registados para a atividade antioxidante das micropartículas, pelas metodologias DPPH, ABTS e FRAP, encontram-se sumarizados na tabela 6 e foram obtidos utilizando as curvas de calibração referidas no ponto 4.1. Tal como para a quantificação dos compostos fenólicos as micropartículas foram divididas em três variações distintas: PU, PE e PQ.

Tabela 8 - Valores de TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) para as micropartículas (expresso em mmol Trolox por mg de micropartículas (mmol Trolox / mg micropartículas)), Média \pm Desvio-padrão

		TEAC (mmol Trolox / mg micropartículas)		
		PU	PE	PQ
Alecrim	DPPH	$0,05 \pm 3,57 \times 10^{-3}$	$0,29 \pm 7,37 \times 10^{-4}$	$0,01 \pm 2,3 \times 10^{-4}$
	ABTS	$0,36 \pm 7,77 \times 10^{-2}$	$2,99 \pm 5,79 \times 10^{-3}$	$0,02 \pm 1,61 \times 10^{-3}$
	FRAP	$0,00 \pm 3,37 \times 10^{-6}$	$0,04 \pm 1,58 \times 10^{-5}$	$0,00 \pm 1,32 \times 10^{-6}$
Chá-verde	DPPH	$0,05 \pm 2,41 \times 10^{-3}$	$1,19 \pm 2,42 \times 10^{-3}$	$0,05 \pm 4,36 \times 10^{-3}$
	ABTS	$0,14 \pm 2,49 \times 10^{-2}$	$2,14 \pm 8,45 \times 10^{-2}$	$0,36 \pm 3,72 \times 10^{-2}$
	FRAP	$0,00 \pm 3,13 \times 10^{-5}$	$0,20 \pm 3,72 \times 10^{-2}$	$0,00 \pm 1,45 \times 10^{-4}$

Os resultados apresentados na tabela 8 sugerem que forma geral houve uma perda de atividade antioxidante para todas as variações de microcápsulas (PE, PD e PQ). Baseado nas observações, pode concluir-se que o processo de encapsulamento e as temperaturas do mesmo são prejudiciais as propriedades dos compostos bioativos em estudo. No entanto é possível verificar-se que as micropartículas homogeneizadas em etanol apresentam valores mais altos de atividade antioxidante após o encapsulamento com inulina para o método ABTS. Quando comparados os valores de TEAC de micropartículas e de extrato é possível confirmar a maior sensibilidade do método ABTS para a quantificação da atividade antioxidante.

4.3. Estabilidade da atividade antioxidante das películas

Efetuuou-se a determinação da atividade antioxidante das diferentes películas em 4 tempos diferentes num período total de 60 dias, como representado na figura 8. Inicialmente, imediatamente após a formação de películas, foram quantificadas as atividades antioxidantes usando as três diferentes metodologias estudadas (DPPH, ABTS, FRAP). Após esta quantificação inicial, as películas, foram armazenadas a 4 °C e na ausência de luz durante um período de 30 dias, ao fim do qual procedeu-se a uma nova quantificação da atividade antioxidante. Por último, as películas foram incubadas numa câmara de fitoclima (Fitoclima 750E, Aralab), a uma temperatura constante de

22°C e com uma alternância entre 12 horas de luz e escuro, as películas foram analisadas após 15 e 30 dias de armazenamento.

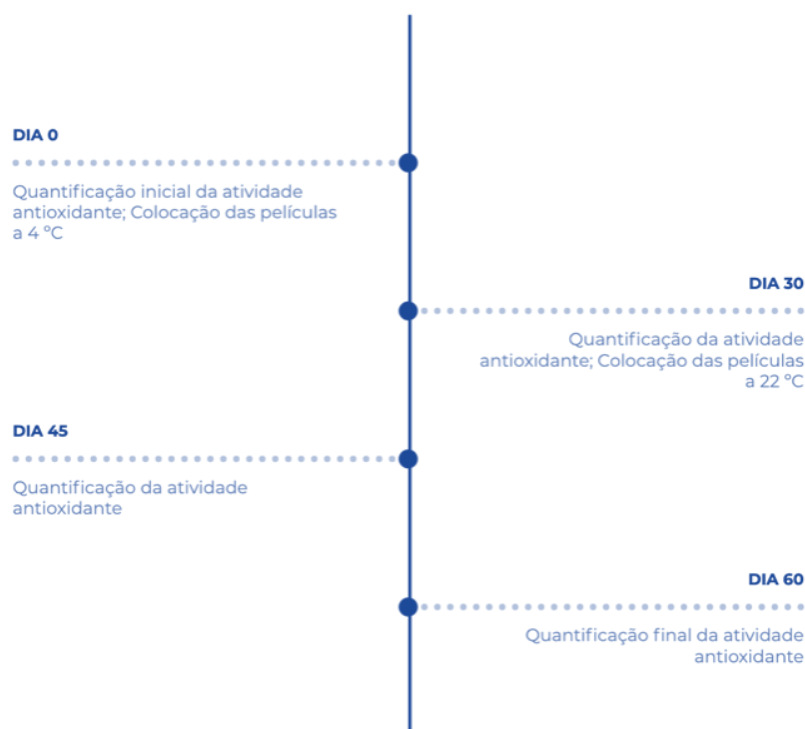


Figura 8 - Cronograma de quantificações de atividade antioxidantes e armazenamento das películas.

A utilização de duas diferentes condições de armazenamento para as películas visou a simulação de condições reais de armazenamento, podendo assim aferir-se o desempenho das mesmas. Na primeira situação, as películas foram sujeitas a condições de armazenamento semelhantes as registadas por produtos frescos, favoráveis à conservação dos compostos bioativos. No entanto, na segunda situação foi pretendido simular condições extremas de armazenamento, condições estas mais favoráveis à degradação dos compostos bioativos presentes nas películas.

Os resultados foram sumarizados, estando representados nas figuras 9 e 10 os dados referentes ao método DPPH, nas figuras 11 e 12 os dados referentes ao método ABTS e por último, nas figuras 7 e 8 encontram-se sumarizados os dados referentes ao método FRAP. Os resultados apresentados encontra-se expressos em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 $[(\text{mmol Trolox} / \text{mg película}) \times 10^5]$ e cada uma das películas encontra-se identificada por: AQ – Película com cápsulas de alecrim adicionadas a 70 °C durante 5 minutos; AF – Película com cápsulas de alecrim adicionadas à temperatura ambiente; AL – Película com extrato de alecrim livre; CQ – Película com cápsulas de

chá-verde adicionadas a 70 °C durante 5 minutos; CF– Pelicula com cápsulas de chá-verde adicionadas à temperatura ambiente; CL – Pelicula com extrato de chá-verde livre.

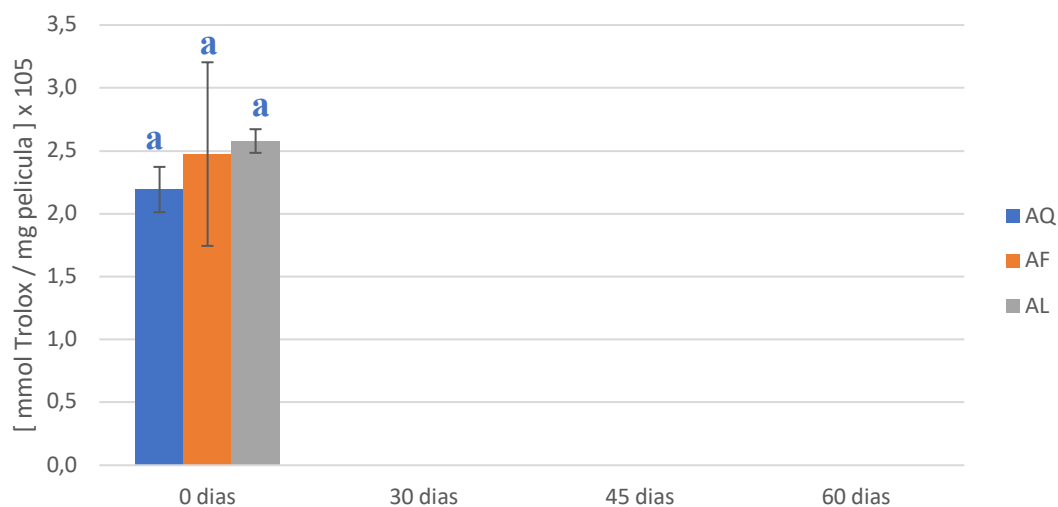


Figura 9 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método DPPH para as películas de Alecrim em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 ($[\text{mmol Trolox} / \text{mg película}] \times 10^5$); Letras diferentes significam valores significativamente diferentes (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$)

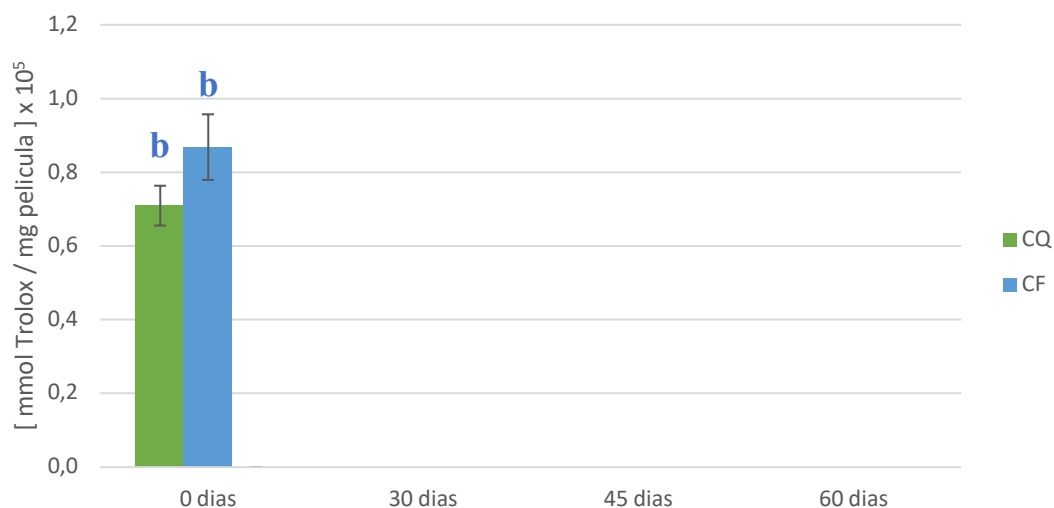


Figura 10 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método DPPH para as películas de Chá-Verde em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 ($[\text{mmol Trolox} / \text{mg película}] \times 10^5$); Letras diferentes significam valores significativamente diferentes (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$)

Numa primeira observação dos dados apresentados nas figuras 9 e 10 é possível concluir que houve a perda total de atividade antioxidante, nas seis diferentes películas, ao final de 30 dias para o método DPPH. Contudo este facto pode não se dever à total degradação de todos os compostos bioativos presentes na película durante

este período de tempo, mas sim à degradação exclusiva dos compostos que se encontram na superfície da película. O material matriz das películas, o quitosano, apresenta maior solubilidade em soluções aquosas ligeiramente ácidas, o que não se regista na solução reacional do método DPPH, que é constituída na sua maior parte por metanol. A impossibilidade de dissolução da película na solução reacional inviabiliza a reação entre os radicais livres da solução DPPH e os antioxidantes presentes no interior da película, não se registando assim qualquer atividade antioxidante nos restantes períodos.

Tal como referido anteriormente, o facto de a solução reacional ser ou não aquosa pode apresentar grande influência nos resultados obtidos. Apesar de existir uma potencial interferência nos resultados apresentados é possível analisar os mesmos em termos de atividade antioxidante perdida após cada período de incubação.

De um modo geral, é possível observar-se nas figuras 11 e 12 a perda de atividade antioxidante com o decorrer dos dias para o método ABTS.

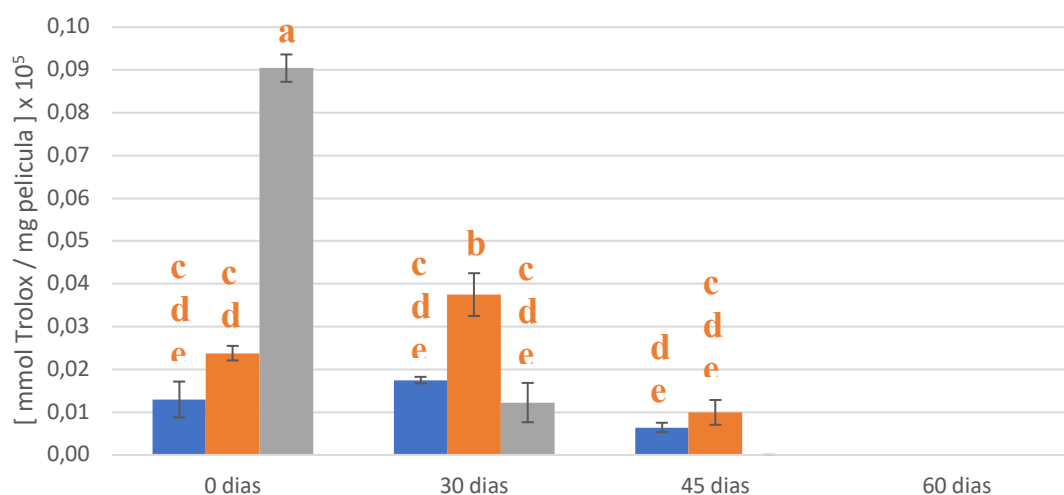


Figura 11 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método ABTS para as películas de Alecrim em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10⁵ ($\text{mmol Trolox} / \text{mg película} \times 10^5$); Letras diferentes significam valores significativamente diferentes (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$)

Em respeito as películas com incorporação de extrato livre de alecrim é possível verificar, que apesar de apresentarem valores superiores de atividade antioxidante para o dia 0, apenas mantiveram 14 % da sua atividade antioxidante inicial ao fim de 30 dias a 4 °C e ausência de atividade após incubação a 22 °C, registando assim a degradação mais acentuada de todas as películas em estudo. Para as películas com incorporação

de extrato livre de chá-verde não foi obtida qualquer atividade antioxidante para esta metodologia, podendo este facto dever-se a um erro experimental.

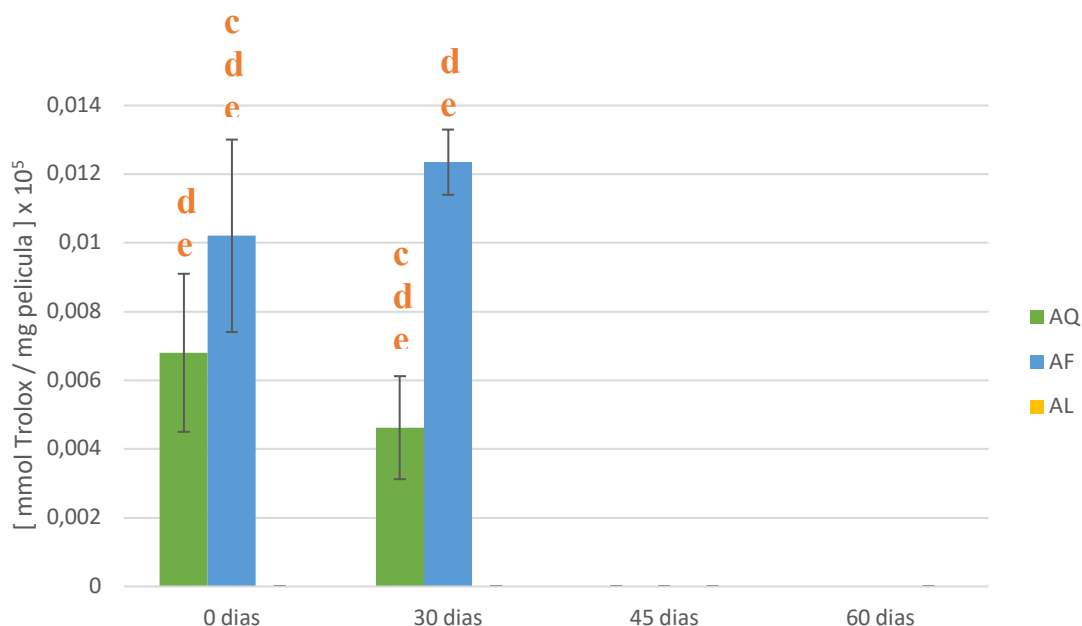


Figura 12 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método ABTS para as películas de Chá-Verde em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10⁵ ([mmol Trolox / mg película] x 10⁵); Letras diferentes significam valores significativamente diferentes (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$)

Quando analisadas as películas incorporadas com compostos bioativos encapsulados, verifica-se de forma geral uma manutenção das suas características quando incubadas a 4 °C, mantendo todas a sua atividade antioxidante inicial exceptuando a película CQ que apenas manteve 68 % da sua atividade inicial. Após a incubação a 22 °C verificou-se a perda total do poder antioxidante das películas incorporadas com microcápsulas de chá-verde e, tendo as películas de alecrim, AF e QQ, mantido 27 e 37 %, respetivamente, da sua atividade registada aos 30 dias. Nas figuras 8 e 9, estão representados os dados referentes as atividades antioxidantes obtidos através do método FRAP.

Ao contrário do registado nas duas metodologias anteriores, DPPH e ABTS, a solução reacional do método FRAP é aquosa e o procedimento experimental implica que a reação ocorra a uma temperatura de 37 °C. Estes factos permitem uma maior dissolução da película na mistura reacional, e consequentemente uma maior interação entre os compostos bioativos presentes em cada película e o reagente FRAP presente na solução, permitindo assim uma análise de todo o volume de película.

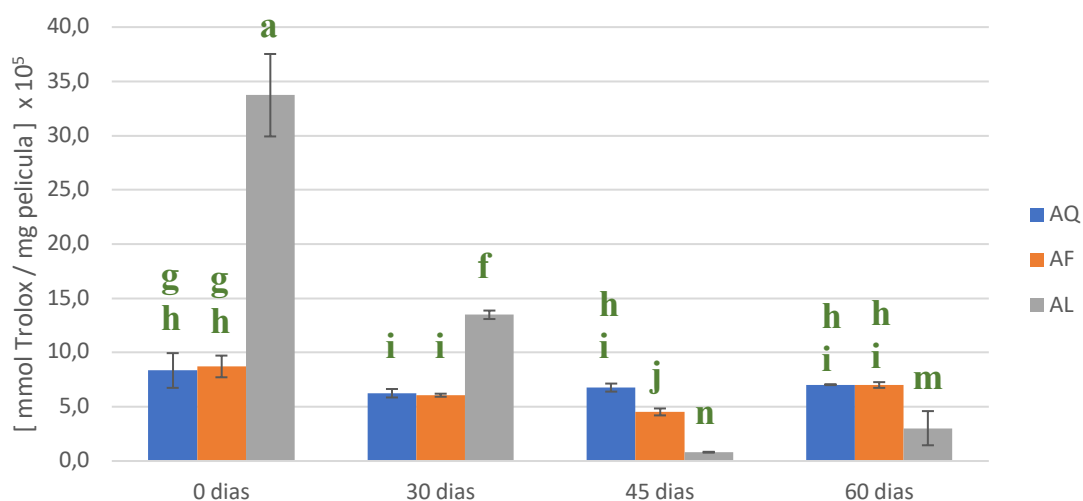


Figura 13 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método FRAP para as películas de Alecrim em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 ($[\text{mmol Trolox} / \text{mg película}] \times 10^5$); Letras diferentes significam valores significativamente diferentes (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$)

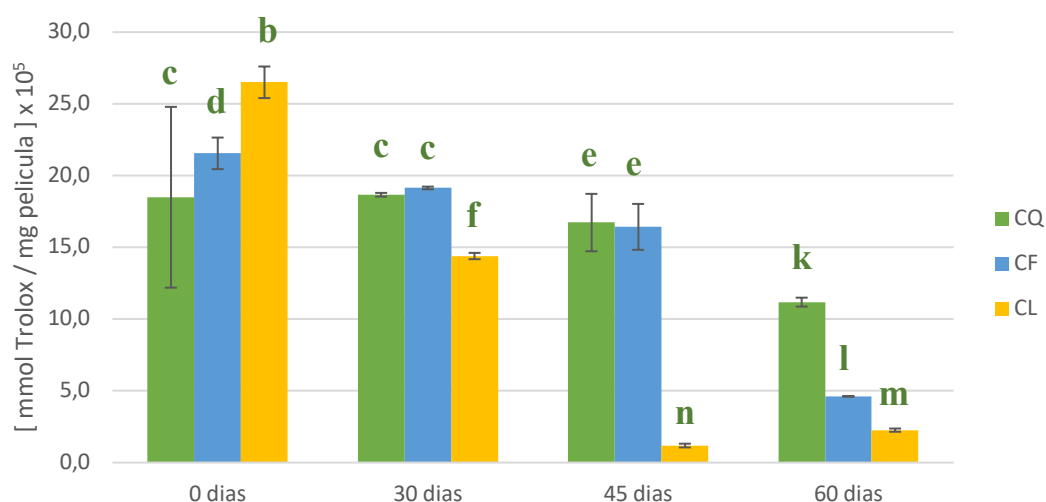


Figura 14 - Atividades antioxidantes obtidas pelo método FRAP para as películas de Chá-Verde em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 ($[\text{mmol Trolox} / \text{mg película}] \times 10^5$); Letras diferentes significam valores significativamente diferentes (Tukey HSD, $\alpha = 0,05$)

Através de uma análise preliminar às figuras podemos retirar uma conclusão semelhante a verificada nas outras metodologias, as películas incorporadas com extrato livre apresentam uma maior sensibilidade às condições de armazenamento, quando comparadas com as películas com compostos bioativos encapsulados. Estas películas registaram uma perda de aproximadamente 50 % do seu poder antioxidante durante o armazenamento a 4 °C e a perda total da sua atividade quando expostas as condições de armazenamento a 22 °C.

Quando analisadas as películas, após armazenamento a 4 °C, com compostos bioativos encapsulados podemos verificar que mantiveram de forma geral a sua atividade antioxidante. As películas AQ e AF mantiveram 75 % e 70 % da sua atividade inicial. Tendo a película CQ mantido a totalidade da sua atividade e a película CF mantido 89 %.

Ao contrário do verificado nas restantes metodologias, para películas com compostos bioativos encapsulados, a perda máxima de atividade antioxidante após incubação a 22 °C é de apenas 25 % no primeiro período de armazenamento nestas condições. Tendo a película AF mantido a totalidade do seu poder antioxidante, a película AQ - 75 %, a película CF- 90 % e por último a película CQ - 75 % da sua atividade antioxidante inicial.

Para o período de armazenamento entre o dia 45 e o dia 60 foi possível verificar uma manutenção total de atividade antioxidante para as películas AQ e AF, e manutenção de 66 % e 28 % para as películas CQ e CF, respetivamente. Para as películas incorporadas com extrato de alecrim e de chá-verde na forma livre, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo na atividade antioxidante. Este aumento registado pode ser devido a libertação de compostos antioxidantes anteriormente aprisionados na matriz filmogénica do quitosano.

Na tabela 9 encontram-se representadas as atividades antioxidantes das películas ao longo dos 60 dias, para todas as metodologias estudadas.

Tabela 9 – Resumo das atividades antioxidantes obtidas pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP para as películas de Alecrim e Chá-verde em estudo. Resultados apresentados em mmol de Trolox por mg de película vezes 10^5 ($[\text{mmol Trolox} / \text{mg película}] \times 10^5$). Média \pm Desvio-padrão. Q – Película com cápsulas de extrato adicionadas a 70 °C durante 5 minutos; A – Película com cápsulas de extrato adicionadas à temperatura ambiente; AL – Película com extrato não encapsulado.

			TEAC			
			[mmol Trolox / mg película] x 10 ⁵			
			0 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias
DPPH	Alecrim	Q	2,19 \pm 0,18	0	0	0
		A	2,47 \pm 0,73	0	0	0
		L	2,58 \pm 0,09	0	0	0
	Chá-Verde	Q	0,71 \pm 0,05	0	0	0
		A	0,87 \pm 0,09	0	0	0
		L	0	0	0	0
ABTS	Alecrim	Q	0,01 \pm 4,20 x10 ⁻³	0,02 \pm 7,60 x10 ⁻⁴	0,01 \pm 0,00	0
		A	0,02 \pm 1,70 x10 ⁻³	0,04 \pm 5,00 x10 ⁻³	0,01 \pm 0,00	0
		L	0,09 \pm 3,20 x10 ⁻³	0,01 \pm 4,60 x10 ⁻³	0	0
	Chá-Verde	Q	0,01 \pm 2,30 x10 ⁻³	0,00 \pm 1,50 x10 ⁻³	0	0
		A	0,01 \pm 2,80 x10 ⁻³	0,01 \pm 9,50 x10 ⁻⁴	0	0
		L	0	0	0	0
FRAP	Alecrim	Q	8,35 \pm 1,60	6,25 \pm 0,39	6,77 \pm 0,37	7,04 \pm 0,04
		A	8,72 \pm 1,00	6,07 \pm 0,14	4,53 \pm 0,32	7,01 \pm 0,26
		L	33,72 \pm 3,80	13,48 \pm 0,39	0,81 \pm 0,04	3,03 \pm 1,58
	Chá-Verde	Q	18,49 \pm 6,30	18,67 \pm 0,13	16,73 \pm 2,00	11,18 \pm 0,31
		A	21,55 \pm 1,10	19,14 \pm 0,09	16,43 \pm 1,60	4,61 \pm 0,01
		L	26,51 \pm 1,10	14,40 \pm 0,22	1,19 \pm 0,13	2,26 \pm 0,11

Conclusões

Após a realização deste estudo foi possível verificar a possibilidade da produção de películas de quitosano com atividade antioxidante através da incorporação de compostos bioativos extraídos a partir de alecrim e de chá-verde.

Observou-se também que as micropartículas produzidas através do processo de secagem por atomização apresentam uma menor atividade antioxidante quando comparadas com extratos etanólicos, este facto pode ser devido a um baixo carregamento das micropartículas ou à degradação dos compostos antioxidantes presentes em ambos os extratos quando sujeitos as condições de elevadas temperaturas do processo de secagem.

Quando observadas as atividades antioxidantes das películas com extrato na forma livre e das películas incorporadas com micropartículas, observou-se uma elevada variabilidade entre as metodologias utilizadas, tendo sido o método FRAP o que revelou uma maior sensibilidade para a quantificação de compostos antioxidantes. Este facto deve-se à maior dissolução da película, solúvel em água, na mistura reacional, uma solução aquosa.

Foi possível observar-se o decréscimo generalizado do poder antioxidante das películas, com o decorrer do tempo, e quando sujeitas as condições de incubação mais severas. Inicialmente, com condições de incubação de 4 °C, condições favoráveis à conservação de compostos antioxidantes, observou-se uma ligeira redução no potencial antioxidante, este menor quando os compostos se encontravam em micropartículas. Quando sujeitas às condições mais severas de incubação, 22 °C, verificou-se uma diminuição acentuada ou total nas atividades antioxidantes para as películas com extrato livre. Para as películas com micropartículas verificou-se um decréscimo significativamente menor da atividade antioxidante, quando comparadas com as películas com extrato livre, permitindo assim verificar a eficiência da conservação do poder antioxidante de compostos bioativos em micropartículas durante longos períodos de tempo e em condições de armazenamento.

Os resultados obtidos revelam que a incorporação de compostos bioativos microencapsulados em películas de quitosano tem elevado potencial no

desenvolvimento de películas bioativas e biodegradáveis, especialmente se esses compostos bioativos forem encapsulados a temperaturas de 70°C durante 5 minutos.

Sugestões de trabalho futuro

De acordo com os resultados apresentados anteriormente e de forma a melhor se caracterizar as películas e os compostos bioativos microencapsulados nelas incorporadas surgiram diferentes sugestões de desenvolvimento de trabalho futuro, tais como:

- Avaliação de diferentes compostos bioativos e quantidades a fim de melhorar o potencial antioxidante das películas;
- Conjugação de diferentes compostos bioativos com diferentes matrizes encapsulantes de forma a otimizar a retenção dos mesmos;
- Caracterização das propriedades higroscópicas das películas através de estudos de capacidade de absorção de água e solubilidade, isothermas de adsorção, permeabilidade ao vapor de água;
- Estudo das propriedades mecânicas e morfológicas das películas, como estudos de extensão e perfuração, e análise por microscopia de varrimento (SEM);
- Avaliação das películas formuladas em relação ao seu potencial antioxidante e ao seu efeito no desenvolvimento ou inibição de microrganismos em diferentes produtos alimentares;
- Aplicação de análise sensorial na verificação de alteração das características organoléticas causadas pelas películas em alimentos

Bibliografia

- Anal, A. K. e Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 240–251.
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M. e Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film, *LWT – Food Science and Technology*, 92, 497–508.
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., Garrigós, M. D. C., Valente, A. J. M. e Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol, *Journal of food engineering*. 121, 94–101.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A. e Mahomoodally, M. F. (2016). Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius, *Journal of Herbal Medicine.*, 6, 88–95.
- Baptista, J., Lima, E., Paiva, L., Andrade, A. L. e Alves, M. G. (2012). Comparison of Azorean tea theanine to teas from other origins by HPLC/DAD/FD. Effect of fermentation, drying temperature, drying time and shoot maturity. *Food Chemistry*, 132, 2181–2187-
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Januário, M. I. N., Vicente, A. A., Beirão-da-Costa, M. L. e Delgadillo, I. (2013). Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil, *Food Hydrocolloids.*, 33, 199–206
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. e Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55, 7879–7885.
- Campos, E., Branquinho, J., Carreira, A. S., Carvalho, A., Coimbra, P., Ferreira, P. e Gil, M. H. (2013). Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *Food Chemistry*, 49, 2005–2021.
- Cao, T. L., Yang, S. Y. e Song, K. Bin (2018). Development of burdock root inulin/chitosan blend films containing oregano and thyme essential oils, *International Journal of Molecular Science*, 19, 1–12.
- Castro, F. V. R., Andrade, M. A., Sanches Silva, A., Vaz, M. F. e Vilarinho, F. (2019). The Contribution of a Whey Protein Film Incorporated with Green Tea Extract to Minimize the Lipid Oxidation of Salmon (*Salmo salar* L.), *Foods*, 8, 327.

Champagne, C. P. e Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 184–190.

Conselho Europeu: Diretiva 2004/12/CE do Parlamento e Conselho Europeu de 11 de fevereiro de 2004 que altera a Diretiva 94/62/CE relativa à declaração de embalagens e resíduos de embalagens pelo Conselho, Comissão e o Parlamento Europeu, J. Of. da União Eur., L47, 26–31, 2004.

Corrêa-Filho, L. C., Moldão-Martins, M. e Alves, V. D. (2019). Advances in the application of microcapsules as carriers of functional compounds for food products, *Applied Sciences*.

Dufresne, C. J. e Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 404–421.

Durango, A. M., Soares, N. F. F., Benevides, S., Teixeira, J., Carvalho, M., Wobeto, C. e Andrade, N. J. (2006). Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan, *Packaging Technology and Science*, 19, 55–59.

Dvaranauskaite, A., Venskutonis, P. R., Raynaud, C., Talou, T., Viškelis, P. e Sasnauskas, A. (2009). Variations in the essential oil composition in buds of six blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars at various development phases, *Food Chemistry*, 114, 671–679.

Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L. e Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review, *Trends Food Science Technology*, 31, 138–155.

Fai, A., Montenegro Stamford, T. e Montenegro Stamford, T. (2008). Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9, 435–451.

Fátima, N. De, Soares, F., Fátima, N. De, Soares, F., Azevêdo, W. e Clarissa, A. (2009). Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos, *Rev. Ceres*, 56, 370–378.

Fernandes, R. V. D. B., Borges, S. V. e Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil, *Carbohydrate Polymers*, 101, 524–532.

- Fernandes, R. V. de B., Borges, S. V. e Botrel, D. A. (2013). Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties, *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 33, 171–178.
- Forester, S. C. e Lambert, J. D. (2013). Antioxidant effects of green tea, *Mol Nutr Food Res*, 55, 844–854.
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*, 87, 287–291.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. e Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends Food Science Technology*, 15, 330–347.
- Ko, S., Janes, M. E., Hettiarachchy, N. S. e Johnson, M. G. (2001). Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 66, 1006–1011.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. e Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *American Journal of Medicine*, 113, 71–88.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P. e Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*, *Food Hydrocolloids*, 22, 373–386.
- Laura, P. F., Garzón, M. T. e Vicente, M. (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 58, 161–171.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin, *Food Hydrocolloids*, 21, 928–935.
- Loo, J. Van, Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebreg, H. e Smits, G. (1995). On the Presence of Inulin and Oligofructose as Natural Ingredients in the Western Diet, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 525–552.

Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R. e Franco, D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties, *Meat Science*, 96, 526–534.

Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M. e Alves, V. D. (2019) Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications, *Molecules*, 24, 14–16.

Marsh, K. e Bugusu, B. (2007). Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary, *Journal Food Science*, 72.

Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., Yépiz-Gómez, M. S. e Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydrate Polymers*, 82, 305–315.

Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W. e Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads, *Food Control*, 18, 878–884.

Moderno, P., Carvalho, M. e Silva, B. (2012) Recent Patents on *Camellia sinensis*: Source of Health Promoting Compounds, *Recent Patents Food, Nutrition Agriculture.*, 1, 182–192.

Pinheiro, a C., Cerqueira, M. a, Souza, B. W. S., Martins, J. T., Teixeira, J. (2010). Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares, *Boletim. da Biotecnologia*, Outubro, 18–20.

Ponce, P., Bueno, V. B. e Lugão, A. B. (2009) Filmes Biodegradáveis Produzidos Com Poli (Caprolactona) (Pcl) E Nanopartículas De Prata : Embalagens Ativas Para Maçã, *An. do 10o Congr. Bras. Polímeros*, 9.

Portes, E., Gardrat, C., Castellan, A. e Coma, V. (2009) Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties, *Carbohydrate Polymers*, 76, 578–584.

Shahidi, F. e Han, X.-Q. (2001). Microencapsulation of food ingredients, *Food Research International*, 53, 220–223.

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. e Jeon, Y. J. (1999) Food applications of chitin and chitosans, *Trends Food Science. Technology.*, 10, 37–51.

Vigneshwaran, N., Ammayappan, L. e Huang, Q. (2011). Effect of Gum arabic on distribution behavior of nanocellulose fillers in starch film, *Food Research International*, 1, 137–142.

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J. e Li, H. Bin (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 20–31.

Yeo, Y. (2005). Recent Advances in Microencapsulation Technology, *Encyclopedia of Pharmaceutical*, 2315 – 2327.